

がん転移抑制剤の標的酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ - 2  
(MMP-2) に対し、高い選択性を持つインヒビターの開発

# がん転移抑制剤の標的酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ - 2(MMP-2)に対し、高い選択性を持つインヒビターの開発

Development of a highly selective inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)

東 昌 市

(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科)

はじめに

高等動物の組織において細胞が移動するためには障壁となる細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) をいったん破壊する必要がある。ECM は主にコラーゲン、エラスチン、ラミニン、フィブロネクチンなどのタンパク質成分と、ヒアルロン酸やグリコサミノグルカンなどの多糖から構築されているが、発生や創傷治癒、炎症などの生理的あるいは病理的過程では、これら ECM 成分の分解、除去、再構築が起き、それに細胞の増殖、移動、分化が共役することで、正常組織の構築や維持、再生が可能になる。この ECM 分解に重要な役割を果たすのがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) と呼ばれる一群のタンパク質分解酵素である。

悪性のがん組織では、幾つかの MMPs が高発現し、がん細胞の浸潤・転移に寄与することが示されたことから、筆者がこの研究に加わった 1995 年頃は製薬会社を中心に多くの MMPs 阻害剤が開発され、臨床試験が行われつつあった。しかしながら、2000 年代に入ると、遺伝子欠損マウスの解析や一遺伝子多型 (SNP) 解析の結果から、ヒトで見出されている 24 種の MMPs の全てが、がんの浸潤・転移を促進するのではなく、特異性の低い阻害剤によって標的以外の MMPs が阻害されると、がんの転移を助長する可能性や、副作用が現れることが示唆された。事実、これまでに開発された多くの低分子 MMPs 阻害剤はいずれも特異性が低く、臨床試験において、がんの抗転移抑制効果が明確でなかったり、様々な副作用が確認された。残念なことに、これらの理由により、がん治療薬としての利用に至った MMPs 阻害剤は一例もないというのが現状である。

期待が大きただけにこの「MMPs 阻害剤の失敗」の影響は大きく、多くの製薬企業が MMPs 研究から撤退し、現在国内の MMPs 研究者は非常に少なくなってしまった。しかし、上述のように MMPs を標的としたがん治療薬開発の失敗の原因が比較的明確であることや、一部の MMPs は依然として良好ながん治療のターゲット分子であること、幾つかの MMPs はがん以外の病態の標的分子と成り得ることなどから、筆者は個々の MMPs に対し、高い特異性を持つインヒビターの開発が重要であると考え、

研究を進めている。本稿では筆者が 1995 年に横浜市立大学木原生物学研究所の宮崎香研究室の助手として赴任して以来、最も長く携わってきたテーマであるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の分子内に見出された MMP-2 選択的インヒビター領域の研究を中心に、がん治療の良好な標的 MMPs の一つである MMP-2 のユニークな活性発現・調節機構と、そのメカニズムを応用した高選択性インヒビターの開発について概説する。

## 修飾 TIMP-2 による MMP-2 前駆体の活性化抑制法の発見

筆者が MMPs 研究に加わった当時、当研究室ではアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド  $\beta$ -タンパク質 (A $\beta$ ) の前駆体 ( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP) が MMP-2 阻害活性を持つことが見出されていた (1)。また、I 型の細胞膜貫通タンパク質である APP は細胞膜表層に存在する未同定のメタロプロテアーゼ (仮称  $\alpha$ -セクレターゼ) によって A $\beta$  領域内で切断を受けると、神経毒性をもつ A $\beta$  を産生することなく分解されることから、当時この膜表在性メタロプロテアーゼの機能不全がアルツハイマー病の発症に関与すると考えられ、その同定が急がれていた。一方で、がん細胞の細胞表層に発現し、MMP-2 前駆体(pro-MMP-2)の活性化に関わる膜型 MMP(MT1-MMP) が金沢大学がん研究所の清木元治教授 (現東大医科学研究所所長) のグループによって発見されていた (2)。そこで、最初に頂いたテーマが細胞表層に存在する MT1-MMP あるいは MMP-2 が APP の切断に関わる可能性を調べることであった。残念ながら、A $\beta$  領域内での APP 切断には A disintegrin and a metalloproteinase (ADAM) とよばれる別のクラスのメタロプロテアーゼが主として関わることが明らかになり、MMPs は主役ではないだろうという結論に至ったが、この解析の過程で幾つか面白い発見があった。その一つが生理的 MMPs インヒビタータンパク質である tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) のインヒビター活性部位を化学修飾した分子を用いて MT1-MMP による pro-MMP-2 の活性化を特異的に抑制する方法の発見である。

1995 年当時、MT1-MMP による pro-MMP-2 の活性化についても精力的な研究がなされ、ユニーク且つ複雑なメカニズムが提唱されていた (3)。そのメカニズムでは、まず、MT1-MMP の酵素活性部位に TIMP-2 の N-末端に存在するインヒビター部位が結合する。次に、TIMP-2 の C-末端側に MMP-2 の非酵素ドメインと結合する部位が存在し、この部位を介して pro-MMP-2 が結合すると、細胞膜上に MT1-MMP・TIMP-2・pro-MMP-2 からなる 3 分子複合体が形成される。最後に TIMP-2 の結合していない (酵素活性がある) MT1-MMP によって 3 分子複合体中の pro-MMP-2 が切断を受け活性型酵素に変換されるというものである。したがって、MMPs インヒビターである TIMP-2

は、このメカニズムの中では両面テープの役割を果たし、pro-MMP-2 を MT1-MMP が存在する細胞表層へ繋ぎ留めることにより、その活性化反応を惹起する。そこで、筆者は TIMP-2 のインヒビター部位のみを破壊し、両面テープを片面テープへと変換することで、pro-MMP-2 の活性化が阻止出来るのではないかと考えた。

このアイデアに至った頃、偶然にも筆者が横浜市立大学に赴任する直前に短期留学でお世話になったドイツ・マックスプランク研究所の Wolfram Bode 博士のグループが TIMP-1 と MMP-3 との複合体の結晶解析に成功し、TIMP の主鎖の N 末端  $\alpha$ -アミノ基の窒素原子が MMP の活性中心亜鉛イオンに配位していることを発見した(4)。そこで、TIMP-2 の N 末端  $\alpha$ -アミノ基をシアン酸イオンを用いてカルバミル化したところ、その MMP インヒビター活性が完全に消失することを見出した。また、このインヒビター活性を失った N 末端カルバミル化 TIMP-2 をコンカナバリン A で刺激したヒト繊維肉腫由来 HT1080 細胞に添加したところ、内在性 MT1-MMP による pro-MMP2 の活性化が阻害されることが明らかになった(5)。この結果は上述の MT1-MMP による pro-MMP2 活性化メカニズムの検証にも役立ったが、この修飾 TIMP-2 を用いることにより MT1-MMP の酵素活性を阻害することなく、MMP-2 の活性化のみを阻害することから、培養細胞系において内在性 MT1-MMP 活性と MMP-2 活性を区別する際に有効であった。後述のように筆者らはこのツールを用いることにより APP の新規切断酵素を特定することができた。

#### APP の新規プロセッシングの発見とその責任酵素の同定

細胞表層に存在する MT1-MMP あるいは MMP-2 が  $\alpha$ -セクレターゼの本体か否かに対する答えは否定的であったが、研究の過程でこの 2 つの MMPs のいずれかが APP 細胞外領域の新規切断に関わる可能性が出て来た。すなわち、HT1080 細胞の培養上清には  $\alpha$ -セクレターゼ切断で放出される 105 kDa の APP 断片 (soluble APP, sAPP) が検出されたのに対し、この細胞をコンカナバリン A で刺激して内在性の MT1-MMP 活性の上昇と MMP-2 の活性化を誘導すると、それに付随して培養上清中に 90 kDa の新規 APP 断片が現れることを見出した。この 90 kDa の APP 断片は sAPP の C 末端側エピトープを欠いていることから、APP が  $\alpha$ -セクレターゼ部位よりも N 末端側で切断を受け、sAPP よりも短い細胞外領域が放出されていることが予想された。そこで、この 90 kDa の APP 断片 truncated sAPP (sAPPtrc) と命名した(図 1)。興味深いことに sAPP が MMP-2 インヒビター活性を持つのに対し、sAPPtrc にはその活性がなかったことから、後の MMP-2 インヒビター領域の同定につながった。

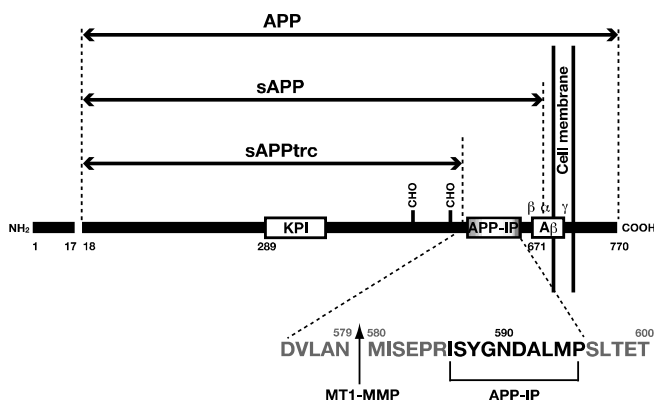


図1 アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 分子内の MMP-2 インヒビター領域 (APP-IP)  
 KPI:Kuniz 型プロテアーゼインヒビター領域, Aβ: アミロイドβタンパク質領域  
 α, β, γ: それぞれ、α-, β-, γ-セクレターゼによる切断部位

一方、sAPPtrc の産生に MT1-MMP あるいは MMP-2 が関与する状況証拠はあったものの、その当時は RNA 干渉の技術がまだ普及していなかったため、培養細胞系における責任酵素を特定することは意外に困難であった。そこで、筆者らは選択性の低い低分子メタロプロテアーゼ阻害剤、MMPs ファミリーを広く阻害する TIMP-2, MMPs ファミリーを広く阻害するが、MT1-MMP に対する阻害活性のみが弱い TIMP-1, および MMP-2 の活性化を特異的に阻害する N 末端カルバミル化 TIMP-2 の 4 種類のインヒビターを用いて調べた結果、低分子 MMPs 阻害剤と TIMP-2 が sAPPtrc の産生を阻害したのに対し、TIMP-1 と N 末端カルバミル化 TIMP-2 は全く阻害しないことが明らかになり、MMP-2 ではなく MT1-MMP が責任酵素であることを特定した (6)。

さらに、細胞が MT1-MMP 活性を発現している場合には sAPPtrc が ECM に蓄積し、MT1-MMP 活性を発現していない場合には、MMP-2 インヒビター活性を持つ sAPP が蓄積することを見出し、以下のような酵素の調節機構を考案した。すなわち、MT1-MMP 密度が低い細胞表面からは主にインヒビター領域を含む sAPP が放出され、この断片が周囲の ECM に結合することにより、ECM が MMP-2 による分解から保護されるが、MT1-MMP が集積している浸潤先端部位ではインヒビター領域を含まない sAPPtrc が大量に放出され、これが sAPP と置き換わるため、ECM が MMP-2 により分解されやすくなると考えた。このようなメカニズムによって細胞表層近傍の特異領域に限定された ECM の分解が可能になり、組織内での細胞移動を容易にするのではないかと予想している (6)。この仮説はさらに検証の必要があるが、後述のように APP 分子内の MMP-2 インヒビター領域は MMP-2 に対し高い選択性を持つことから、APP は MT1-MMP/MMP-2 軸の特異的な調節分子であることが予想される。

#### APP 分子内 MMP-2 インヒビター領域の同定

MMP-2 インヒビター活性が sAPP には存在し、sAPPtrc には存在しないことを足掛

かりに、sAPP の C 末端側領域のアミノ酸配列を含む様々なタンパク質断片や合成ペプチドのインヒビター活性を調べ、その最小単位を同定した結果、APP<sub>770</sub> の 586-595 番目に相当する ISYGN DALMP 配列がインヒビター領域を形成することを明らかにした (図 1)。興味深いことに、このアミノ酸配列を持つ 10 残基ペプチド (APP-derived inhibitory peptide, APP-IP と命名) は sAPP と比較して約 10 倍高い MMP-2 阻害活性を示し、その阻害の IC<sub>50</sub> 値は 30 nM であった。また、APP-IP の酵素選択性について調べたところ、APP-IP の MMP-3、MMP-7、MMP-9 および MT1-MMP に対する阻害活性は IC<sub>50</sub> 値で比較して MMP-2 阻害活性の 70 ~ 1,000 倍弱いことが判明し、APP-IP が高い MMP-2 選択性を持つことが明らかになった (7)。今日に至るまで生理的インヒビターや天然化合物、合成 MMP 阻害剤を問わず、APP-IP ほど MMP-2 に対して高い選択性を持つインヒビターは見つかっていない。

一方、APP-IP の N-末端側あるいは C-末端側から 1 残基ずつアミノ酸を削ったり、内部配列のアミノ酸残基を Ala に置換すると、MMP-2 に対する親和性が顕著に低下することから、10 アミノ酸残基残基のほぼ全てが MMP-2 活性部位との相互作用に寄与することが予想された。このことは後に MMP-2 触媒ドメインと APP-IP との複合体の結晶構造解析により証明されたが、この研究で種々の APP-IP のバリエーションを作製したことが、APP-IP の高選択性 MMP-2 阻害機構の解明に役立った。

動物種間で APP のアミノ酸配列を比較すると、APP-IP 配列が哺乳類、鳥類および魚類に至るまで良く保存されているのに対し、その周辺配列の相同性は低いことが判明した。したがって、進化の過程においても APP-IP が保存され、その MMP-2 活性制御機構の重要性が示唆された。しかし、APP 遺伝子欠損マウスでは明確な機能異常が見られておらず、その生理的重要性は証明されていない。これは MMP-2 遺伝子欠損マウスにも明確な機能異常がないことに対応するものかも知れないが、未知の環境下や病理条件下において上記活性制御機構が重要になる可能性は残されている。

#### APP-IP との選択的相互作用に寄与する MMP-2 の構造要素の同定

2000 年代の半ば以降になると、がん治療の標的 MMPs と反標的 MMPs が分類されるとともに (8)、個々の MMP に特異的なインヒビター開発の重要性が認知され始め、化合物ライブラリーからの探索や従来型低分子インヒビターの修飾、ファージディスプレイ法などを用いて選択的 MMP インヒビターの創出が試みられた。しかし、APP-IP ほど高い選択性をもつインヒビターは無かったことから、筆者は APP-IP が如何にして選択性を発揮するのかということに興味を持った。

そこで、MMP-2 の触媒ドメインと MMP-7、あるいは MMP-9 の触媒ドメインの各パーツ（アミノ酸配列）を組み合わせる種々の“キメラ MMPs”を作製し、これらの酵素活性に及ぼす APP-IP の阻害活性を調べることで、MMP-2 のどの部位が APP-IP との選択的相互作用に寄与しているのかを明らかにすることを試みた(9)。

ところで、それまでに明らかにされていた種々の MMPs の結晶構造から、各 MMPs の触媒ドメインの主鎖は、同様に折り畳まれており、それらの構造を重ね合わせると  $\alpha$ -炭素のトレースはほぼ一致することが分かっていた。事実、この研究で作製したほとんど全てのキメラ MMPs が酵素活性を持っており、異なる MMPs から取り出したパーツを組み合わせても酵素機能に重要な立体構造が保持されていることが分かった。これは各 MMPs の触媒ドメインの構造が互いに酷似していることを反映するとともに、触媒ドメイン（活性部位）を標的とした特異的インヒビター創出の難しさを反映するのも知れない。

上記キメラ MMPs を用いた解析により、筆者らは APP-IP の酵素選択性に関わる酵素側の構造要因をアミノ酸残基レベルで明らかにしたところ、MMP-7 と MMP-9 が APP-IP との相互作用において異なる部分に障害を持つことを見出した。すなわち、MMP-9 では基質結合クレフトの非プライム側（基質ペプチドの切断部位の N 末端側と相互作用する酵素側の部位）に存在する Pro<sup>87</sup> と Gln<sup>93</sup> が障害となり、MMP-7 ではプライム側（基質ペプチドの切断部位の C 末端側と相互作用する部位）の 144-147 に相当する NGDP 配列が障害になっていた。これらの部位は MMP-2 活性中心の亜鉛イオンから比較的遠い位置に存在していたことから、MMPs の基質結合クレフトの構造において、活性中心から遠い部位に各 MMP で個性があることが予想された。

さらに、APP-IP 側のアミノ酸残基を修飾した種々のペプチドと上記キメラ MMPs の相互作用を調べることで、酵素側の 94 番目のアミノ酸が APP-IP 側の Pro<sup>10</sup> と、また、酵素側 144-147 番目の部分が APP-IP の Tyr<sup>3</sup> と相互作用することが示唆され、APP-IP の N→C 末端の配向が基質ペプチドとは逆向きになるように酵素側の基質結合クレフトに結合することが予想された。この結合様式は後に MMP-2・APP-IP 複合体の結晶構造解析で証明されたが、恐らく、逆向きに結合することにより APP-IP 内のペプチド結合が酵素活性中心に呈示されず、加水分解を受けずに基質結合クレフトに留まることが、このペプチドのインヒビター機能を支えていると考えた。

ところで、MMPs 前駆体の構造において N 末端側に存在するプロペプチドの一部は基質結合クレフトをマスクし、分子内インヒビターとして機能しているが、この配列部分の N→C 末端の配向も基質ペプチドとは逆向きになっている。そこで、活性型 MMP-2

の N 末端に、プロペプチドの代わりに APP-IP 配列を付加したところ、分子内インヒビターとして作用し、MMP-2 活性が完全にマスクされることを見出した。これに対し、MMP-2 の C 末端に APP-IP 配列を付加した場合は MMP-2 活性はマスクされないことから、APP-IP が分子内にあって適切な配向で活性部位に呈示されることが強力な活性阻害に重要であると考えられた。この結果は後述の MMP-2 に対し、高い選択性を持ち、且つ強力なインヒビタータンパク質 APP-IP-TIMP-2 の分子設計において重要なヒントとなった。

### MMP-2・APP-IP 複合体の結晶構造解析

上述のキメラ MMPs を用いた解析から、APP-IP による MMP-2 選択的阻害機構に対する重要な示唆が得られたものの、これら 2 分子間の相互作用を詳細に解明するためには酵素-インヒビター複合体の立体構造解析が必須であった。そうした中、2010 より幸運にも本学戦略的研究推進費の研究ユニット「標的蛋白質の構造解析に基づく合理的創薬」のメンバーに入れて頂き、佐藤衛教授、橋本博准教授との共同研究により、MMP-2・APP-IP の複合体の結晶解析を行うことが出来た(10)。当研究室において竹内友香氏(当時学部 4 年)と小松恭子氏(当時博士前期課程 2 年)が MMP-2 の触媒ドメインを調製し、APP-IP との複合体形成の後に佐藤衛研究室において結晶化および X 線解析を行った。

その結果、予想通り、APP-IP は N→C 末端の配向が基質ペプチドとは逆向きになるように MMP-2 の基質結合クレフトに結合していることが判明した。また、APP-IP の Asp<sup>6</sup> 側鎖のカルボキシル基が MMP-2 活性中心の亜鉛イオンをキレートしていることが明らかになり、APP-IP の Asp<sup>6</sup>→Ala 置換により MMP-2 阻害活性が顕著に低下(IC<sub>50</sub> 値が 10,000 倍に上昇)する過去のデータ(7)と良く一致した。尚、これまで見出された天然のメタロプロテアーゼインヒビターで、カルボキシル基を活性中心亜鉛イオンに配位させるものは見つかっていないことから、APP-IP は新しいタイプのメタロプロテアーゼインヒビターであることが判明した。

また、APP-IP の Ala<sup>7</sup>-Pro<sup>10</sup> と Tyr<sup>3</sup>-Ile<sup>1</sup> 部分がそれぞれ、MMP-2 基質結合クレフト内の S2-S5 および、S1'-S3'部位と相互作用しており、これらの広域にわたる相互作用が高い MMP-2 選択性に深く関わることが予想された。すなわち、基質結合クレフト内の活性中心近傍の構造は MMPs 間で酷似しているものの、このクレフト全体の構造はそれぞれの MMP 間で異なるため、クレフト全体と相互作用する APP-IP が酵素選択性を発揮できるのではないかと推察した。これに対し、従来型阻害剤は低分子であるが故に酵素と多くの相互作用を持つことができず、全ての MMPs に共通する触媒部位の亜

鉛イオンを中心に相互作用することが、選択性が得られない要因となると考えた。この酵素阻害様式の解明は将来、個々の MMP に対して高い特異性を持つ阻害剤の設計・開発に重要な手がかりを与えるものと考えた。

### APP-IP-TIMP-2 融合タンパク質の創出

上述のように、TIMP-2 の主鎖の N 末端  $\alpha$ -アミノ基を修飾すると、MMP インヒビター活性が完全に失われるのに対し、MMP-2 の非触媒ドメインに対する結合能は保持されることが分かっていた。一方、APP-IP 配列を MMP-2 分子内に付加し、活性部位に適切に呈示すると、MMP-2 活性を強く阻害することが判明した。

これら 2 つの結果から発想して、TIMP-2 と MMP-2 非触媒ドメインとの相互作用を利用し、APP-IP を MMP-2 の活性部位近傍に呈示させる方法を考案した (11)。すなわち、TIMP-2 の N 末端に APP-IP のアミノ酸配列を付加することで、TIMP-2 の持つ低選択性 MMPs インヒビター部位を破壊すると同時に、この部位に MMP-2 選択的インヒビター配列である APP-IP を導入し、TIMP-2 と MMP-2 非触媒ドメイン間の特異的相互作用を利用しつつ、導入した APP-IP 配列部分を MMP-2 の活性部位に近づけようというものである (図 2)。

TIMP-2 の N 末端に APP-IP 配列を付加した融合タンパク質 (APP-IP-TIMP-2 と命名) を作製し、その活性を調べたところ、TIMP-2 が持っていた他の MMPs に対する阻害活性は失われていたのに対し、MMP-2 に対しては強力な阻害活性 ( $K_i = 0.7 \text{ pM}$ ) を持つことが判明した。また、ペプチドである APP-IP は培養がん細胞中で速やかにそのインヒビター活性を失うのに対し (半減期 30 min) 融合タンパク質 APP-IP-TIMP-2 は細胞とともに 4 日間インキュベートしても全く活性が失われなかった。

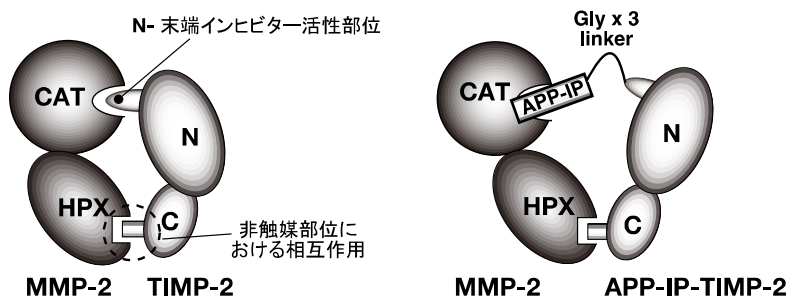


図 2 APP-IP-TIMP-2 による MMP-2 阻害様式  
TIMP-2 (左) と APP-IP-TIMP-2 (右) による MMP-2 阻害様式を模式的に表した。  
CAT: 触媒ドメイン, HPX: ヘモペクシン様 (非触媒) ドメイン



融合タンパク質設計の際に、この安定性の上昇を狙っていた訳ではなかったが、一般にオリゴペプチドが生体内で分解を受け易いこと、および APP-IP は N 末端あるいは C 末端のアミノ酸残基が 1 残基削られただけで、顕著に活性が低下することを考慮すると、培養細胞が分泌する MMPs 以外のプロテアーゼ（例えばペプチドを末端から分解するエキソペプチダーゼ類）によって APP-IP が分解を受け易いのに対し、融合タンパク質では TIMP-2 部分の立体障害によりプロテアーゼがアクセスできず、APP-IP 部分が分解から保護されるのではないかと予想した。

APP-IP は MMP-2 に対し、高い選択性を持つインヒビターであったが、その不安定さにより、培養細胞系や *in vivo* での利用が制限されていた。しかし、融合タンパク質にして安定性が飛躍的に上昇したことにより、これらの系での利用が可能となり、生理的および病理的条件における MMP-2 の機能を簡便に調べる上で有効なプローブとなることが期待される。事実、筆者らは APP-IP-TIMP-2 が MMP-2 を分泌しているがん細胞の移動やこの細胞による IV 型コラーゲンの分解を抑制することを明らかにしている（11）。

ところで、N 末端修飾 TIMP-2 により MT1-MMP による pro-MMP-2 の活性化が阻害されることを前に述べたが、APP-IP-TIMP-2 もまた N 末端修飾 TIMP-2 であることから、pro-MMP-2 の活性化を阻害する可能性が考えられた。そこで、培養がん細胞を用いてこの融合タンパク質が pro-MMP-2 の活性化におよぼす効果を調べた結果、N 末端カルバミル化 TIMP-2 とほぼ同等に pro-MMP-2 の活性化を阻害することが判明した。したがって、APP-IP-TIMP-2 は 2 つのメカニズム（pro-MMP-2 活性化阻害と MMP-2 の活性阻害）で MMP-2 の活性発現を阻止すると考えられる。しかし、近年 pro-MMP-2 が pro-MMP-2・TIMP-2・MT1-MMP からなる 3 分子複合体の形成を介さずに活性化される経路が複数存在することが報告されていることを考慮すると、生体内における MMP-2 の機能を調べるためには APP-IP-TIMP-2 の持つ強力な MMP-2 活性阻害能がより重要になってくるであろう。

## 今後の展望

がん細胞が基底膜を破壊して浸潤・転移する際に基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解が重要になるが、MMP-2 はこの IV 型コラーゲンに対し、強い分解活性を持っていることから、APP-IP-TIMP-2 はこの基底膜浸潤を抑止するのに有効な薬剤と成り得る可能性がある。また、近年 MMP-2 が血小板凝集を促進することが明らかになりつつあり、今回設計した融合タンパク質は血栓症の予防薬として開発することも可能

かも知れない。さらに、他の種々の疾患における MMP-2 の関与も示唆されており、APP-IP を利用したプローブはこれら病態の解明に役立つ可能性がある。

一方、APP-IP による MMP-2 選択的阻害様式が解明されたことから、APP-IP のアミノ酸配列の中で、他の MMPs との相互作用の障害となるアミノ酸残基を修飾することで、他の MMP に対する選択性を高めたインヒビターペプチドを創出できる可能性がある。現在当研究室でこの可能性を確かめるべく研究を進めている。

ごく最近、血液凝固第 Xa 因子に対する特異的インヒビターが抗血栓剤として開発されたり、インクレチンを不活性化するプロテアーゼ DPPIV のインヒビターが糖尿病治療薬として注目されるなど、過去に見出されたプロテアーゼが各種疾患治療の標的分子として再注目されている。将来、個々の MMP に対する特異的インヒビターが、がんをはじめとした疾患治療薬として開発されることを期待したい。

## 謝辞

これまで述べたように本研究では一つの研究成果から次のテーマやヒントが生まれ、一連の研究を進めるなかで興味深い分子を創出することができた。こうした研究のきっかけと支援を与えて頂いた宮崎香教授に感謝したい。また、MMP-2・APP-IP の複合体の結晶構造解析により、APP-IP による MMP-2 選択的阻害様式の詳細を明らかにすることができた。結晶構造を解明して頂いた鶴見キャンパスの橋本博准教授、佐藤衛教授に感謝する。最後に本稿ではすべてのテーマを紹介することが出来なかったが、宮崎・東研究室の多くの大学院生、学部学生が研究に取り組み貢献して頂いたことを記したい。

## 参考文献

1. Miyazaki, K., Hasegawa, M., Funahashi, K., and Umeda, M. (1993) *Nature* **362**, 839–841
2. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994) *Nature* **370**, 61–65
3. Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5331–5338
4. Gomis-Rüth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., and Bode, W. (1997) *Nature* **389**, 77–81
5. Higashi, S., and Miyazaki, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10497–10504
6. Higashi, S., and Miyazaki, K. (2003) *Biochemistry* **42**, 6514–6526
7. Higashi, S., and Miyazaki, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 14020–14028

8. Overall, C. M., and Kleinfeld, O. (2006) *Nat. Rev. Cancer* **6**, 227–239
9. Higashi, S., and Miyazaki, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 10068–10078
10. Hashimoto, H., Takeuchi, T., Komatsu, K., Miyazaki, K., Sato, M., and Higashi, S. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 33236–33243
11. Higashi, S., Hirose, T., Takeuchi, T., and Miyazaki, K. (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 9066–9076